"نشریه علوم زراعی ایران"
جلد بیست و یکم، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۸

مقاله پژوهشی

ارزیابی تغییرات در بیان ژن‌های *miR156* و *miR172* و ژن‌های هدف آنها (*AP2* و *SPL3*؛ عامل بهاره‌سازی) در دو رقم گندم نان (*Triticum aestivum* L.)

Evaluation of gene expression changes of *miR156* and *miR172* and their targeted genes (*AP2* & *SPL3*; vernalization factors) in two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars

نوشین آشوری[۱]، رضا فتوت[۲]، مریم مرتضایی‌فر[۳] و نسترن مهری[۴]

چکیده

آشوری، ن.، ر. فتوت. م. مرتضایی‌فر و ن. مهری. ۱۳۹۸. ارزیابی تغییرات در بیان ژن‌های *miR156* و *miR172* و ژن‌های هدف آنها (*AP2* و *SPL3*؛ عامل بهاره‌سازی) در دو رقم گندم نان (*Triticum aestivum* L.). **نشریه علوم زراعی ایران. ۲۱(٤): ۳۲۷-۳۱۵.**

گذر به مرحله گلدهی از طریق بهاره‌سازی اثر چشمگیری بر تحمل سرما و صفات زراعی غلات زمستانه دارد. مشخص شده است که در بسیاری از گیاهان، RNAهای کوچک نقش مهمی را در زمان گلدهی دارند. شواهدی وجود دارند که نشان می‌دهند خانواده‌های *miR156* و *miR172* نقش اساسی در گذر به مرحله گلدهی گیاهان را ایفا می‌کنند. در این پژوهش بیان دو ژن با تنظیم زمانی *miR156*، *miR172* و ژن‌های هدف آن‌ها (*SPL3*، *AP2*) در دو رقم گندم نان بهاره (باژ) و زمستانه (نورستار) در سال زراعی ۹۷-۱۳۹٦ مورد ارزیابی قرار گرفت. بهاره‌سازی در معرض تیمار سرمایی چهار درجه سانتی‌گراد بمدت دو و ١٤ روز در مرحله گیاهچه اعمال گردید. زمان گلدهی که بر اساس تعداد برگ نهایی برآورد شد فقط در رقم زمستانه نورستار تحت تیمار بهاره‌سازی کاهش معنی‌داری داشت. همچنین نتایج تجزیه واریانس نشان داد که برهمکنش تیمارهای بهاره‌سازی و ارقام گندم نیز بر تعداد برگ نهایی معنی‌دار بود. مقایسه بیان ژن‌ها با استفاده از روش bootstrapping نشان داد که ژن *miR172* در تیمار بهاره‌سازی فقط در رقم نورستار کاهش بیان معنی‌داری داشت. بیان ژن *miR156* نیز تحت تیمار بهاره‌سازی دو رقم گندم کاملاً متفاوت بود. افزایش میزان بیان ژن *miR156* در رقم باژ معنی‌دارنبود، ولی تیمار بهاره‌سازی باعث کاهش معنی‌دار بیان این ژن در رقم نورستار گردید. اگرچه القای بیان ژن *AP2* در بهاره‌سازی ١٤ روزه در هر دو رقم مشاهده شد، با این حال، بیان ژن *SPL3* فقط در رقم نورستار کاهش معنی‌داری داشت و این کاهش در بهاره‌سازی دو روزه بسیار قابل توجه بود. برخلاف تصور، رابطه معنی‌داری بین افزایش بیان *miRNA* ها و کاهش بیان ژن‌های هدف آنها در دو رقم گندم مورد مطالعه وجود نداشت. این موضوع نشان می‌دهد که سازوکار مولکولی زمان گلدهی در گندم پیچیده بوده و اساسا هنوز ناشناخته است.

واژه‌های کلیدی: اپی‌ژنتیک، تنش سرما، زمان گلدهی، گندم و microRNA.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۱۶ تاریخ پذیرش:۰۵ /۱۳۹۸/۱۱ مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول می‌باشد.

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان
۲- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: r_fotovat@znu.ac.ir)
۳- دانشجوی دکتری دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان
۴- دانشجوی دکتری دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان

مقدمه

تکامل در گیاهان مناطق سردسیر منجر به ظهور ژنوتیپ‌هایی شده است که با برنامه‌ریزی دوره رشد برای گذراندن زمستان سخت، در فصل مناسب وارد مرحله زایشی شده و دورهٔ زندگی آنها کامل می‌شود. مرحله زایشی در گیاهان حساس‌ترین مرحله به تنش‌های محیطی از جمله سرما است. بسیاری از گونه‌های گیاهی آب و هوای سرد و معتدل برای شروع گلدهی در فصل بهار نیاز به قرار گرفتن در یک دورهٔ زمانی مشخص سرمای زمستانه دارند این نیاز سرمایی برای گلدهی، به عنوان بهاره‌سازی شناخته شده است (Bernier and Périlleux, 2005). بهاره‌سازی از سازگاری‌های مهم غلات زمستانه به سرما است که باعث می‌شود رشد گیاهان متناسب با تغییرات فصل کنترل شده و در شرایط سخت زمستان، مرحله زایشی گیاه از تنش سرما مصون باقی بماند (Fowler *et al*., 1996).

در گندم نان دو نوع تیپ رشدی بهاره و زمستانه وجود دارد که تفاوت آن‌ها به دلیل نیاز به بهاره‌سازی است تجزیه و تحلیل ژنتیکی در جو و گندم نشان داده است، که سه ژن *VRN1*، *VRN2* و *VRN3* نیاز به بهاره‌سازی را تعیین می‌کنند (Kumar, Sharma, *et al*., 2012). دلیل اصلی تفاوت در ژنوتیپ‌های بهاره و پاییزه، وضعیت آللی در *VRN1* است که بر نمو زایشی و بهاره‌سازی اثر می‌گذارد. ژنوتیپ‌های بهاره آلل غالب (*Vrn1*) و ژنوتیپ‌های پاییزه آلل مغلوب (*vrn1*) را حمل می‌کنند. تفاوت اصلی میان این دو آلل در میزان تجمع رونوشت‌ها بوده و تفاوت ساختاری در توالی‌های رمز کننده آن‌ها وجود ندارد. بطوریکه ژنوتیپ‌های حامل آلل بهاره *Vrn1* به طور پیوسته سطوح بالایی از VRN1 را بیان می‌کنند و امکان نمو زایشی را، بدون نیاز به بهاره‌سازی، می‌دهند. در مقابل ژنوتیپ‌های اختیاری و زمستانه با دارا بودن آلل مغلوب *vrn1* موجب تأخیر در تجمع رونوشت‌های VRN1 شده و موجب طولانی‌تر شدن مرحله رویشی می‌گردد (Knox *et al*., 2010). آلل‌هایی از *VRN1* که دارای سطح بیان بالایی هستند آغازش گل‌آذین را تسریع کرده و بر آلل‌هایی که تنها بعد از بهاره‌سازی بیان می‌شوند، غالب می‌باشند از طرف دیگر آلل‌های *VRN1* که سطح بیان بالایی دارند، بیان ژن دیگر یعنی *VRN2* را سرکوب می‌نمایند (Yan *et al*., 2003). تنوع آللی در نواحی راه‌انداز ژن *VRN1* به تفصیل مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج مطالعات نشان داده است که نواحی در اینترون اول *VRN1* وجود دارد که برای سرکوب رونویسی ضروری هستند (Yan *et al*., 2004). ارزیابی‌های بیوانفورماتیکی نشان داده است که عوامل رونویسی متصل شونده به نواحی راه‌انداز ژن *VRN1* عمدتاً از گروه MADS-box و CDS بوده و علاوه بر سرما ارتباط نزدیکی با طول روز دارند (Peng *et al*., 2016).

با وجود بررسی‌های فراوانی که روی ژن‌های *VRN1* و نقش آن در بهاره‌سازی گندم صورت گرفته است، مطالعه در مورد سایر سازوکارهای درگیر در بیان ژن‌های موثر در گلدهی گندم اندک بوده و به همین دلیل در نحوه تنظیم ژن‌های دخیل در بهاره‌سازی به نقش miRNA ها کمتر پرداخته شده است. مولکول‌های miRNA، RNAهای کوچک اندوژن رمز نشونده با طول ۲۵-۱۹ نوکلئوتید هستند که در فرآیندهای مختلف زیستی نقش حیاتی دارند. نقش miRNA در پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی و غیر زیستی به اثبات رسیده است (Voinnet, 2009, 2012). با بررسی‌های به‌عمل آمده در سایر گیاهان مشخص شده است که خانواده‌های miR156 و miR172 بیشترین تأثیر را در زمان گلدهی دارند و خانواده miR156 در آرابیدوپسیس توسط جایگاه *MIR156a-j* رمزگذاری می‌شود (Wu *et al*., 2009,). بررسی‌ها نشان داده است که بیان بیش از حد miR156 باعث تأخیر در گلدهی گیاهان مختلفی مانند برنج، گوجه فرنگی

و ذرت می‌شود که نشان دهنده نقش تکاملی حفظ شده آن در گلدهی است (Zhang *et al.*, 2011). ژن هدف خانواده miR156 عامل رونویسی (SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE) *SPL*می‌باشد و خانواده miR172 که توسط جایگاه *MIR172a–e* رمزگذاری می‌شود، به نواحی پایین دست miR156 تاثیر گذاشته و برهمکنش آن با miR156 بر زمان گلدهی گیاهان مختلف به اثبات رسیده است (Wu *et al.*, 2009). توالی miR172 بالغ، فراوانی mRNA و یا ترجمه فاکتور رونویسی APETALA2 (AP2) را تنظیم می‌کند (Chen, 2004). بیان miR156 در مرحلهٔ جنینی و مرحلهٔ جوانه‌زنی بسیار زیاد بوده و با افزایش سن گیاه در آرابیدوپسیس کاهش می‌یابد، در صورتی که miR172 در برگ‌ها و جوانه‌های گل‌دهنده انباشته می‌شود (Wu *et al.*, 2009). بررسی‌ها نشان داده است که افزایش بیان miR156 در آرابیدوپسیس و ذرت، ویژگی‌های رویشی جوانه را افزایش داده و گلدهی را به تأخیر می‌اندازد (Wu and Poethig, 2006). در حالی که افزایش بیان miR172 در آرابیدوپسیس گلدهی را سرعت می‌بخشد (Aukerman and Sakai, 2003, Chen, 2004,). عامل رونویسی SPL حاوی دومین حفاظت شده SBP بوده که در بسیاری از فرایندها مانند نمو بافت، پاسخ به تنش‌های زنده وغیرزنده و تحریک و فعال‌سازی سایر فاکتورهای رونویسی نقش دارند و همانند بسیاری از عوامل رونویسی گیاهان توسط miRNA ها کنترل می‌شوند، ژن *AP2* که هدف miR172 می‌باشد متعلق به خانواده AP2/ERF و زیر خانواده AP2 می‌باشد. این زیرخانواده در گیاه آرابیدوپسیس شامل ۱۵ عضو است. نتایج مطالعات نشان داده است این ژن در القای مریستم گل، اندازه اندام، آغازش گل، نمو اندام گل و تکثیر سلولی شرکت دارد(Wang *et al.*, 2009). همانطوریکه ذکر شد تفاوت ساختاری در توالی‌های رمز کننده ژن *Vrn1* وجود ندارد بلکه تنظیم میزان بیان آن است که موجب تغییر در فنوتیپ گیاهان زمستانه از بهاره می‌شود. این موضوع اهمیت مطالعه نحوه تنظیم ژن‌های درگیر در بهاره‌سازی را نشان می‌دهد.

بر اساس بررسی منابع بعمل آمده، مطالعات انجام شده در miRNAهای گندم بیشتر در مورد نقش آنها در تنش‌های غیرزیستی مانند سرما بوده و پژوهشی در مورد نقش miRNA در بهاره سازی گندم انجام نشده است. هدف از این آزمایش ارزیابی تغییرات در بیان ژن‌های *miR172* و *miR156* و ژن‌های هدف آن‌ها شامل *AP2* و *SPL3*در طی بهاره‌سازی دو ژنوتیپ بهاره و زمستانه گندم نان بوده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش دو ژنوتیپ گندم؛ باژ (با تیپ رشد بهاره و زودرس) و نورستار (بسیار متحمل به سرما و انجماد با تیپ رشد زمستانه و نیاز درازمدت به بهاره‌سازی- ۴۲ روز)، بودند (جدول ۱).

جدول ۱- خصوصیات گیاهی ارقام گندم مورد آزمایش

Table 1. Plant characteristics of wheat cultivars

ارقام گندم Wheat cultivars	منشاء Origin	سال معرفی Introduction year	عملکرد دانه Grain yield (kg.ha^{-1})	ارتفاع بوته Plant height (cm)	رسیدگی Maturity	رفتار رشدی Growth type
Baj باژ [1]	India هندوستان	1985	4500	95	Early زودرس	S
Norstar نورستار[2]	Canada کانادا	1977	3700	52.9	Late دیرس	W

1. Mousavi *et al.*, 2012 2. Berg *et al.*, 2006

آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و با دو عامل رقم گندم در دو سطح (زمستانه و بهاره) و روزهای بهاره‌سازی در دو سطح (دو و ۱۴روز در دمای چهار

درجه سانتیگراد) همراه با شاهد (بدون تیمار بهاره‌سازی) اجرا شد. سطوح تیمار بهاره‌سازی بر اساس مطالعات قبلی انجام شده در گندم انتخاب شد (Laudencia-Chingcuanco *et al*., 2011). بذرهای هر دو رقم گندم به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در گلدان کشت شدند. آبیاری با آب مقطر در اوایل رشد به صورت روزانه و پس از پنجه‌زنی با فواصل یک روزه با محلول هوگلند انجام شد. بوته‌های تیمار شاهد تا ظهور برگ پرچم در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای اعمال تیمار سرمای بهاره‌سازی گیاهان چهارده روزه گندم به مدت دو و ۱۴ روز به طور جداگانه در معرض دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و سپس نسبت به نمونه‌گیری از آنها اقدام شد. از اندام هوایی هر تیمار سه تکرار و در هر تکرار سه بوته نمونه‌برداری شده و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار داده شدند. نمونه‌ها تا زمان استخراج RNA کل در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور ارزیابی بهاره‌سازی، گلدان‌های کلیه تیمارها به گلخانه منتقل شده و تعداد برگ‌های نهایی (FLN) روی ساقه اصلی، بعد از تشکیل برگ پرچم، شمارش شدند. این روش به طور مستقیم تغییرات فنولوژیکی نظیر انتقال از مرحله رویشی به زایشی را منعکس می‌کند و مناسب‌ترین شاخص مورفولوژیکی برای تعیین نقطه تکمیل بهاره‌سازی می‌باشد (Fowler *et al*., 1996; Mahfoozi *et al*., 2006). تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت. برای بررسی بیان ژن‌ها، نمونه‌های مربوط به هر تیمار در نیتروژن مایع ساییده شده و حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از آن جهت استخراج RNA با استفاده از بافر استخراج (RNX-Plus شرکت سیناکلون)، همراه با کلروفرم، ایزوپروپانول، اتانول ۷۵ درصد و آب DEPC، طبق دستورالعمل انجام شد. به منظور حذف هر گونه باقیمانده DNA، نمونه‌های RNA استخراج شده با آنزیم DNase 1 و RNASE-free (fermentas) به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. غیرفعال نمودن بقایای آنزیم DNaseI با استفاده از دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. بررسی کمیت RNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ (NANODROP 200, Thermo SCIENTIFI, USA) انجام شد. برای سنجش کیفیت RNA از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد (رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید) در بافر TAE (Tris/Acetate/EDTA) استفاده شد. توالی نوکلئوتیدی ژن‌های مورد نظر (*AP2* , *miR172* و *SPL3* , *miR156*) و ژن *Ta22845* به عنوان کنترل داخلی از پایگاه داده NCBIhttps://www.ncbi.nlm.nih.gov (و miRbase (http://www.mirbase.org/search.shtml) تهیه شدند (جدول ۲). آغازگرهای اختصاصی Stem-Loop به منظور تولید cDNA و آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر در qRT-PCR برای هر miRNA مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط (Chen *et al*., 2005, Varkonyi-Gasic *et al*., 2007) از توالی رسیده (mature sequence) طراحی شدند. به منظور سنتز cDNA ، دو میکرولیتر از آغازگرهای Stem-Loop و Oligo dT به یک میکرولیتر RNA کل اضافه شده و به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و سپس بلافاصله به ظرف یخ منتقل شدند. در مرحله بعدی بافر و آنزیم Reverse Transcriptase (RT) و dNTPs (با استفاده از کیت HyperscriptTM RT Kit master mix) طبق دستور العمل شرکت یکتا تجهیز، اضافه شده و با آب تیمار شده با DEPC به حجم مورد نظر رسیدند. پس از آن نمونه‌ها در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شده و سپس به منظور غیر فعال کردن واکنش، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. واکنش

جدول۲- مشخصات آغازگرهای miRNA و ژن‌های هدف مورد استفاده در Real-time PCR

Table 2. Details of miRNA and target genes primers used for Real-time PCR analysis

نام ژن Gene symbol	شماره دسترسی Accession number		توالی پرایمر Primer sequence	دمای اتصال Tm (°C)
Target gene: *AP2* transcription factors	AB458519.1	Fw	5'ACTTGTATCTCGGCACTTTCAC-3'	60.3
		Rev	5'GATCTTGTCCACGTCGTATCTG-3'	62.1
Target gene: squamosa promoter-binding-like protein 3 (*Spl3*)	KF447885.1	Fw	5'- ACATCTCCGTCGCCTGTG-3'	58.4
		Rev	5'- TCTTGACATTCTGCCCTCC-3'	57.3
*tae-miR172**	MIMAT0020685	Fw	5'- GTTTGGGAGAATCTTGATGATG-3'	59.5
		Rev	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'	55.9
tae-tmiR156	MIMAT0018208	Fw	5'- CGCGATGACAGAAGAGAGTG-3'	60.5
		Rev	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'	55.9
Ta22845	HG670306.1	Fw	5'-GCTGGCTCGTTCAACTGATG-3'	59.04
		Rev	5'-GGACCAAGCGTTCTGATTACTC-3'	60.3
Stem-loop RT PCR primer *miR156*	MI0016450		5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGTGCT-3'	
Stem-loop RT PCR primer *miR172*	MI0018110		5'-GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACATGCAG-3'	

*Homologous miRNA (bdi-miR172a)

Real-time PCR با استفاده از YTA SYBR Green qPCR MasterMix 2X و دستگاه Rotor-Gene Q مطابق دستور العمل مربوطه شامل چهار میکرولیتر SYBR Mix (حاوی Taq DNA SYBR Green پلیمراز و بافر PCR)، دو میکرولیتر از محلول حاوی جفت آغازگر (هر کدام یک میکرومولار)، یک میکرولیتر از محلول cDNA (با غلظت ۵۰ نانوگرم در ماکرولیتر) بود.

بیان ژن‌ها در سه تکرار زیستی برای هر تیمار همراه با دو تکرار تکنیکی اجرا شد. psRNATarget های مورد مطالعه با استفاده از منابع پیشین و همچنین از طریق پایگاه‌های اطلاعاتی miRNA ژن‌های هدف انتخاب شدند (http://plantgrn.noble.org/psRNATarget).

میزان بیان ژن‌ها با استفاده از داده‌های حاصل از Real-time PCR با روش ΔΔct از رابطه زیر محاسبه شدند (Schefe *et al*., 2006):

$$\Delta\Delta ct=\Delta ct(target)-\Delta\ ct(reference)$$

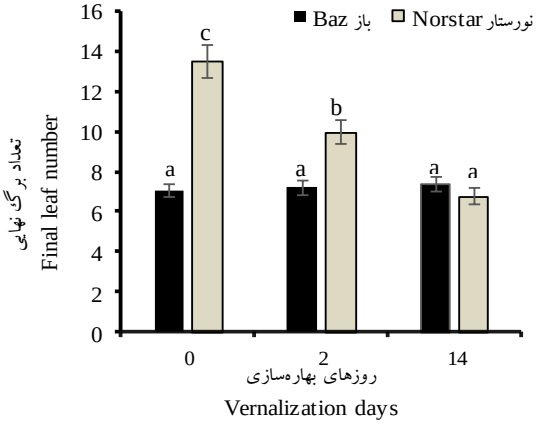
که در این فرمول Δct(target): مربوط به ژن مورد مطالعه و Δct(reference): مربوط به ژن مرجع (کنترل داخلی) هستند.

با توجه به‌اینکه در بررسی بیان ژن به روش Real-time PCR معمولاً مفروضات روش‌های آماری پارامتری وجود ندارد (Rieu and Powers, 2009) بنابراین جهت آزمون معنی‌داری بیان ژن‌ها از روش Bootstrapping و نرم‌افزار REST 2009 استفاده شد.

نتایج و بحث

گرچه صفات زیادی می‌توانند نشان‌دهنده گذر گیاه گندم از مرحله رویشی به زایشی باشند، با این حال تعداد برگ‌های نهایی بعنوان مناسب‌ترین شاخص مورفولوژیکی برای تعیین نقطه تکمیل بهاره‌سازی هستند (Fowler *et al*., 1996; Mahfoozi *et al*., 2006) که بعد از اعمال تیمارها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس نشان‌دهنده اثر معنی‌دار روزهای بهاره‌سازی بر تعداد برگ‌های نهایی و وجود برهمکنش آن با ارقام گندم مورد آزمایش بود. با قرار گرفتن گیاهچه‌های گندم رقم زمستانه نورستار در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، تعداد برگ‌های نهایی کاهش یافتند، در صورتیکه در رقم بهاره باژ، تغییری مشاهده نشد (شکل ۱). نتایج آزمایش‌های متعددی نشان داده است که در ارقام زمستانه بعد از قرار گرفتن در سرمای بهاره‌سازی، تعداد برگ‌های نهایی کاهش یافته و سپس به نقطه‌ای می‌رسد و بعد از آن ثابت می‌ماند. این محدوده زمانی که بستگی به میزان سرما و زمان دارد، محدوده تکمیل بهاره سازی نامیده می‌شود (Fowler *et al*., 1996). با افزایش دورهٔ بهاره‌سازی، تعداد برگ‌ها در رقم زمستانه کاهش بیشتری یافته و به شش برگ تقلیل یافت، در صورتی که در رقم بهاره باژ، تعداد روزهای بهاره‌سازی تأثیری بر تعداد نهایی برگ‌ها نداشت، بنابراین رشد رویشی رقم بهاره بدون تیمار سرمای بهاره‌سازی، تکمیل می‌شود و بهاره‌سازی تأثیری در شروع دوره گلدهی آن ندارد. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که در ارقام گندم فاقد نیاز بهاره‌سازی، مراحل فنولوژیک سریع طی شده و گیاه زودتر وارد مرحله زایشی می‌شود و در نتیجه در صورت وارد شدن تنش سرمایی توانایی تحمل به سرما را نخواهد داشت (Mahfoozi *et al*., 2006). بهاره‌سازی در گیاهان مناطق سردسیر مانند ارقام زمستانه گندم، یک واکنش سازگاری برای گذر از سرمای سخت زمستان است (Fowler *et al*., 1996). این واکنش مرحله رشد زایشی را که حساس‌ترین مرحله به سرما است، از آسیب‌های وارده حفظ کرده و در این گیاهان دوره رشد زایشی تنها هنگامی شروع می‌شود که نیاز گیاه به بهاره‌سازی در اثر سرما اشباع شود (Mahfoozi *et al*., 2006). هر دو فرآیند آغازش آغازه‌های برگ و ظهور برگ‌ها بسیار حساس به درجه حرارت هستند و آزمایش‌های بسیاری ثابت کرده است که سرعت آغازش سنبلچه یک تابع نزولی از تعداد کل

برگ‌ها می‌باشد. بنابراین بر اساس نظر پژوهشگران از بین روش‌های تعیین مراحل بیولوژیکی و فنولوژیکی غلات، تنها تعداد برگ‌های نهایی می‌تواند تغییرات اساسی بیولوژیکی ورود به مرحله زایشی را در گندم به وضوح نشان دهد تغییرات در کاهش تعداد برگ‌های نهایی به وضوح در رقم زمستانه نورستار دیده شد و نشان‌دهنده اثر سرما بر فنولوژی این رقم است. پاسخ رقم نورستار نشان می‌دهد که این رقم دارای نیاز بهاره سازی بالایی است و دیرتر وارد مرحله زایشی می‌شود. این موضوع باعث می‌شود مدت زمان بیان ژن‌های مقاومت به سرما در دوره رشد رویشی بیشتر بوده و باعث مقاومت بیشتر این رقم به سرما می‌گردد(Limin and Fowler, 2006, Mahfoozi *et al*., 2006).



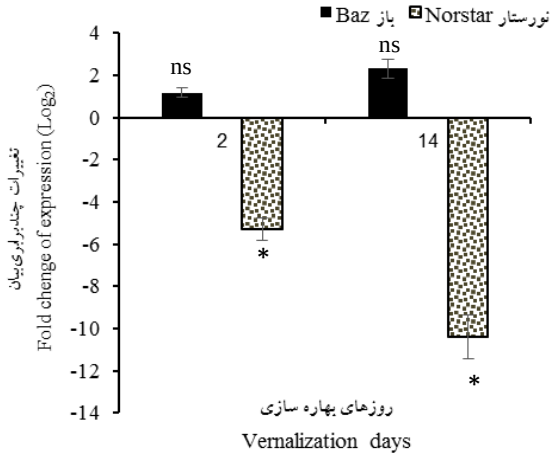
شکل ۱- تغییرات تعداد نهایی برگ در تیمارهای بهاره‌سازی در دو رقم گندم باژ (بهاره) و نورستار (زمستانه)

Fig. 1. Changes of the final leaf number in vernalization treatments in Baj (spring) and Norstar (winter) wheat cultivars

نتایج نشان داد که تیمار دمای بهاره‌سازی در چهار درجه سانتی‌گراد در روزهای هدف، باعث کاهش بیان نسبی ژن *miR172* در گیاهچه‌های گندم رقم نورستار در تیمار سرمایی دو و ۱۴ روز شد که در ۱۴ روز، این کاهش بسیار چشمگیر و معنی‌دار بود (شکل ۲). بیان ژن *miR172* در رقم باژ در هر دو تیمار سرمایی، نسبت به رقم نورستار افزایش یافت و افزایش تعداد روزهای بهاره‌سازی موجب بیان بیشتر آن شد.

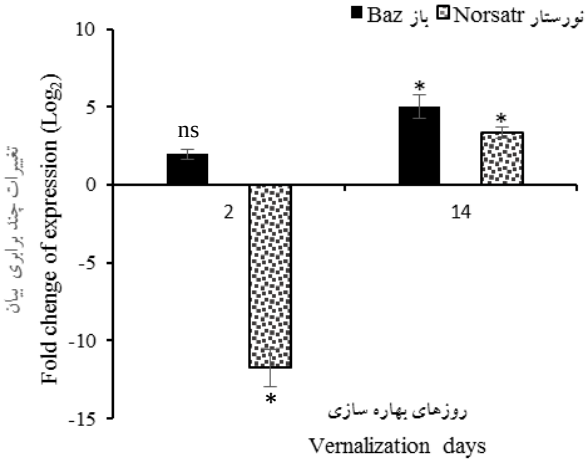
بیان ژن *miR172*، و ژن هدف آن یعنی*AP2* در رقم نورستار در تیمار بهاره‌سازی دو روزه، ابتدا کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد داشته و با افزایش تعداد روزهای بهاره‌سازی به ۱۴ روز، ۳/۳۶ برابر افزایش بیان داشت (شکل ۳). بررسی مقادیر بیان نسبی به‌دست آمده نشان داد که با افزایش مدت زمان بهاره‌سازی به ۱۴ روز، بیان نسبی ژن هدف *AP2* نسبت به تیمار دو روزه، ۳۹ برابر افزایش داشت. روند تغییر ژن هدف *AP2* در رقم باژ به طور کلی متفاوت از رقم نورستار بوده و در هر دو تیمار بهاره‌سازی، میزان بیان آن بیشتر از شاهد و رقم نورستار بود. با افزایش تعداد روزهای بهاره‌سازی، مقدار بیان این ژن در رقم باژ نیز افزایش یافت که بیشترین مقدار آن مربوط به ۱۴ روز بهاره‌سازی بود. ژن مورد بررسی مشابه فاکتور رونویسی *ANT* در آرابیدوپسیس است که فاکتور رونویسی ANT ژن *cyclin CYCD3;1* را هدف‌گذاری می‌کند. این ژن خود نیز در تنظیم تقسیم سلولی و انتقال از فاز G1 به S در چرخه سلولی مشارکت دارد. در مطالعات انجام شده نشان داده شده است که گیاهان تراریخته‌ای که دارای بیان بالایی از ژن *ANT* بودند، دارای نمو سریع‌تر و اندام‌های رویشی و زایشی بزرگ‌تری بودند نتایج بررسی‌ها در گیاه

آرابیدوپسیس نشان داده است که عامل رونویسی به مکان‌های ژنی زیادی که در گلدهی دخالت دارند، متصل می‌گردد از طرف دیگر بیش‌بیان این ژن در گیاه آرابیدوپسیس باعث گلدهی بسیار زودهنگام، بدون محدودیت طول روز شد(Kuluev *et al*., 2015). بنابراین با توجه به اهمیت عامل رونویسی AP2 واکنش شدید



شکل۲- اثر تیمارهای بهاره‌سازی بر بیان نسبی ژن *miR172* در برگ دو رقم گندم باژ (بهاره) و نورستار (زمستانه)

Fig. 2. Effect of vernalization treatments on relative expression of *miR172* gene in the leaf of Baj (spring) and Norstar (winter) wheat cultivars



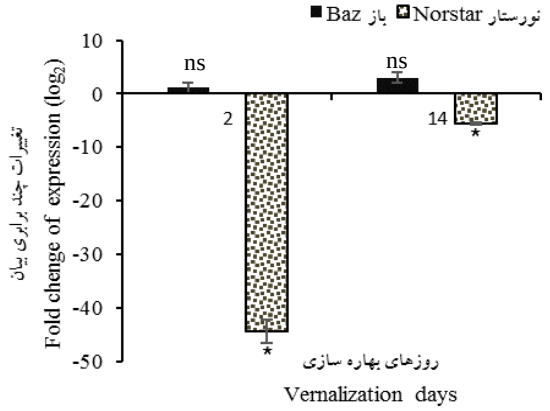
شکل۳- اثر تیمارهای بهاره‌سازی بر بیان نسبی ژن *AP2* در برگ دو رقم گندم باژ (بهاره) و نورستار (زمستانه)

Fig. 3. Effect of vernalization treatments on relative expression of *AP2* gene in the leaf of of Baj (spring) and Norstar (winter) wheat cultivars

بیان ژن آن به هر دو تیمار بهاره‌سازی در رقم زمستانه نورستار، نشان‌دهنده اهمیت این عامل مهم رونویسی در گل‌انگیزی این رقم می‌باشد.

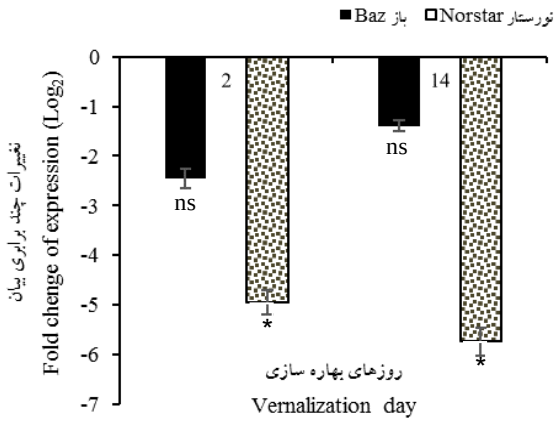
نتایج نشان داد که اثر تیمار بهاره‌سازی بر تغییر بیان نسبی ژن *miR156* در برگ گیاهچه‌های گندم رقم نورستار و باژ متفاوت بود (شکل ۴). در تیمار بهاره‌سازی دو روزه، بیان ژن *miR156* در رقم باژ نسبت به شاهد تفاوت چندانی نداشت، ولی با افزایش تعداد روزهای بهاره‌سازی به ۱۴ روز، میزان بیان آن سه برابر شاهد شد. نتایج نشان داد که

بیان این ژن در رقم نورستار بسیار پایین‌تر از باژ بوده و با بیانی بطور کامل متفاوت با افزایش روزهای بهاره‌سازی به ۱۴ روز، مقدار آن هشت برابر افزایش نشان داد، اگرچه مقدار نهایی آن در رقم نورستار در هر دو تیمار سرمایی نسبت به رقم باژ بسیار پایین بود. بهاره‌سازی به طور کلی بیان ژن هدف *SPL3* را نسبت به شاهد کاهش داد، هر چند نسبت این کاهش در رقم نورستار و باژ متفاوت بوده و در رقم زمستانه نورستار بطور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۵).



شکل۴- اثر تیمارهای بهاره‌سازی بر بیان نسبی ژن *miR156* در برگ دو رقم گندم باژ (بهاره) و نورستار (زمستانه)

Fig. 4. Effect of vernalization treatments on relative expression of *miR156* gene gene in the leaf of of Baj (spring) and Norstar (winter) wheat cultivar



شکل۵- اثر تیمارهای روزهای بهاره‌سازی بر بیان نسبی ژن *SPL3* در برگ دو رقم گندم باژ (بهاره) و نورستار (زمستانه)

Fig. 5. Effect of vernalization treatments on relative expression of *SPL3* gene in the leaf of of Baj (spring) and Norstar (winter) wheat cultivars

miR172 بیان ژن فاکتور رونویسی (*APETALA2*) *AP2*را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Chen, 2004). نتایج بررسی‌ها نشان داده است که miR172 یک گروه کوچک از ژن‌های *AP2-like* از جمله *TOE1*، *TOE2*، *TOE3*، *SMZ* و *SNZ* را در گیاه آرابیدوپسیس نیز تنظیم می‌کند ، این گروه از ژن‌ها جزء تنظیم کننده‌های مهم زمان گل دهی هستند، این ژن‌ها حاوی توالی‌های مکمل miR172 هستند پنج ژن *AP2- like*

اساسا به عنوان سرکوبگرهای گلدهی عمل می‌کنند بر اساس نتایج تحقیقات انجام شده در ذرت، برنج و جو، miR172 در تنظیم انتقال به مرحله زایشی و تشکیل اندام‌های گلدهی و زمان گلدهی اهمیت دارد (Aukerman and Sakai, 2003). در این پژوهش کاهش بیان *miR172* در تیمار بهاره‌سازی ۱۴ روزه در رقم نورستار باعث افزایش ژن هدف *AP2* شد. اگرچه این اثر تنظیمی در رقم باژ و در سایر تیمارها چندان قابل توجه نبود که احتمال دارد این موضوع ناشی از وجود سایر سازوکارهای تنظیمی در تیپ رشدی بهاره باشد. در گیاه آرابیدوپسیس، تاثیر منفی *miR156* بر فاکتورهای رونویسی SPL3، SPL4 و SPL5 در مریستم گزارش شده است و بیان بیش از حد ژن *miR156* باعث تأخیر در گلدهی می‌شود (Wu *et al*., 2009, Wu and Poethig, 2006). نتایج مشابهی در برنج، گوجه‌فرنگی و ذرت نیز گزارش شده است که افزایش در بیان ژن *miR156* سبب تأخیر در گلدهی شده (Zhang *et al*., 2011) و کاهش میزان بیان *miR156* موجب گلدهی زودهنگام می‌گردد ، این نتایج نشان دهنده نقش تکاملی حفاظت شده برای *miR156* در گلدهی بوده و سطوح بالای *miR156* در مراحل اولیه رشدی در گیاهان موجب مهار گلدهی می‌شود که این موضوع برای تکمیل دورهٔ رشد رویشی و احتمالا گذر از دوره‌های تنش سخت سرما، لازم و ضروری است (Huijser and Schmid, 2011).

نتایج پژوهش‌های قبلی در گیاه آرابیدوپسیس نشان داده است که بین ژن‌های مورد مطالعه برهمکنش نیز وجود داشته و miR156 بیان miR172 را از طریق بیان ژن هدف *SPL9* تنظیم می‌کند (Wu *et al*., 2009). کاهش بیان miR156 منجر به افزایش پروتئین SPL9 و در نتیجه افزایش miR172b شده و باعث تحریک گلدهی می‌شود (Wu *et al*., 2009). نتایج بدست آمده در این تحقیق نیز نشان داد که در رقم زمستانه نورستار با افزایش میزان بیان miR156 در تیمار بهاره‌سازی ۱۴ روز، بیان miR172 کاهش چشم‌گیری داشت. گرچه در رقم بهارهٔ باژ چنین اثری دیده نشد. این نتایج نشان‌دهندهٔ تفاوت سازوکارهای تنظیم گلدهی در ارقام زمستانه و بهارهٔ گندم است. کاهش بیش از اندازه بیان ژن *miR156* در تیمار بهاره سازی دو روزه ممکن است بعلت شوک سرمایی وارد شده باشد. در تحقیقات انجام شده قبلی که نتایج آنها با نتایج بدست آمده متفاوت است (Wang, 2014)، بررسی در مرحله گلدهی انجام شده که فرآیند بهاره‌سازی تکمیل شده است، در حالی که این تحقیق در مراحل ابتدایی رشد گیاه صورت گرفته است. بیان بالای miR156 باعث جلوگیری از گلدهی در پاسخ به بهاره‌سازی شده، در حالی که کاهش فعالیت miR156 موجب تسریع گلدهی در مواجهه با بهاره‌سازی می‌شود (Wang, 2014).

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیقات قبلی نشان‌داده است که سازوکارهای بهاره‌سازی باعث تنظیم بیان ژن‌های زیادی در گیاهان می‌شود. مطالعه ژن‌های درگیر در بهاره سازی به فهم این فرآیند مهم کمک می‌کند. نتایج بدست آمده در این آزمایش حاکی از اثر تیمار سرما و بهاره‌سازی در miRNAهای مورد مطالعه و نیز ژن‌های هدف بود. وجود برهمکنش ژنوتیپ و تیمار بهاره‌سازی در بیان miRNAها و ژن‌های هدف، نشان‌دهنده سازگاری مولکولی ارقام زمستانه می‌باشد. برخلاف تصور رابطه معنی داری بین بیان *miRNA* ها و ژن‌های هدف آنها وجود نداشت. این موضوع نشان می‌دهد که سازوکارهای مولکولی زمان گلدهی در گندم پیچیده بوده و اساسا هنوز ناشناخته باقی مانده است. با تجزیه و تحلیل عملکردی اهداف miRNAها در گندم زمستانه تحت فرآیند بهاره‌سازی می‌توان راه‌های جدیدی برای دستورزی و اصلاح گندم زمستانه را برای افزایش تولید در مناطق سردسیر دیم فراهم آورد.

سپاسگزاری

معاونت موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور جهت همکاری در تأمین بذور مورد نیاز تشکر می‌شود.

بدینوسیله از آقای دکتر ساسانی ریاست محترم

منابع مورد استفاده **References**

Aukerman, M. J. and H. Sakai. 2003. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2-like* target genes. Plant Cell. 15: 2730-2741.

Berg, J., P. Bruckner, G. Carlson, A. Dyer, J. Eckoff, G. Kushnak, K. Kephart, N. Riveland, N., Stougaard and D. Wichman. 2006. Winter Wheat Variety Performance Summary in Montana: MAES, USA.

Bernier, G. and C. Périlleux. 2005. A physiological overview of the genetics of flowering time control. Plant Biotechnol. J. 3: 3-16.

Chen, C., D. A. Ridzon, A. J. Broomer, Z. Zhou, D. H. Lee, J. T. Nguyen, M. Barbisin, N. L. Xu, V. R. Mahuvakar and M. R. Andersen. 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem–loop RT–PCR. Nucleic Acids Res. 33(20): e179-e179.

Chen, X. 2004. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development. Science. 303: 2022-2025.

Fowler, D., A. Limin, S. y. Wang and R. Ward. 1996. Relationship between low-temperature tolerance and vernalization response in wheat and rye. Can. J. Plant Sci. 76:42-37.

Horstman, A., V. Willemsen, K. Boutilier and R. Heidstra. 2014. AINTEGUMENTA-LIKE proteins: hubs in a plethora of networks. Trends Plant Sci. 19: 146-157.

Huijser, P. and M. Schmid. 2011. The control of developmental phase transitions in plants. Development. 138: 4117-4129.

Knox, A. K., T. Dhillon, H. Cheng, A. Tondelli, N. Pecchioni and E. J. Stockinger. 2010. *CBF* gene copy number variation at *Frost Resistance-2* is associated with levels of freezing tolerance in temperate-climate cereals. Theor. Appl. Genet. 121: 21-35.

Kuluev, B., A. Avalbaev, E. Nurgaleeva, A. Knyazev, Y. Nikonorov and A. Chemeris. 2015 . Role of *AINTEGUMENTA-like* gene *NtANTL* in the regulation of tobacco organ growth. J. Plant Physiol. 189: 11-23.

Kumar, S., V. Sharma, S. Chaudhary, A. Tyagi, P. Mishra, A. Priyadarshini and A. Singh. 2012. Genetics of flowering time in bread wheat Triticum aestivum: complementary interaction between vernalization-insensitive and photoperiod-insensitive mutations imparts very early flowering habit to spring wheat. J. Genet. 91(1): 33-47.

Laudencia-Chingcuanco, D., S. Ganeshan, F. Yeo, B. Fowler, R. Chibbar and O. Anderson. 2011. Genome-wide gene expression analysis supports a developmental model of low temperature tolerance gene regulation in wheat (*Triticum aestivum* L.). BMC Genomics. 12: 299

Limin, A. E. and D. B. Fowler. 2006. Low-temperature tolerance and genetic potential in wheat (*Triticum aestivum* L.): response to photoperiod, vernalization, and plant development. Planta. 224: 360-366.

Mahfoozi, S., A. E. Limin, F. Ahakpaz and D. B. Fowler. 2006. Phenological development and expression of freezing resistance in spring and winter wheat under field conditions in north-west Iran. Field Crops Res. 97: 182-187.

Mousavi, S. H., S. A. Siadat, Kh. Alami-Saied, E. Zand and A. M. Bakhshandeh. 2012. Evaluation of competitive performance of spring bread wheat cultivars with wild oat weed. Iran. J. Crop Sci. 14(4): 358-369. (In Persian with English abstract).

Peng, F. Y., Z. Hu and R. C. Yang. 2016. Bioinformatic prediction of transcription factor binding sites at promoter regions of genes for photoperiod and vernalization responses in model and temperate cereal plants. BMC Genomics. 17: 573.

Rieu, I. and Powers, S. J. 2009. Real-Time Quantitative RT-PCR: Design, Calculations, and Statistics. The Plant Cell, 21(4): 1031-1033.

Schefe, J. H., K. E. Lehmann, I. R. Buschmann, T. Unger and H. Funke-Kaiser. 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's C_T difference" formula. J. Mol. Medic. 84: 901-910.

Varkonyi-Gasic, E., R. Wu, M. Wood, E. F. Walton and R. P. Hellens. 2007. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. Plant Methods. 3: 12-12.

Voinnet, O. 2009. Origin, biogenesis and activity of plant microRNAs. Cell. 136: 669-687.

Wang, J. W. 2014. Regulation of flowering time by the miR156-mediated age pathway. J. Exp. Bot. 65: 4723-4730.

Wang, Y ,.Z. Hu, Y. Yang, X. Chen and G. Chen. 2009. Function annotation of an SBP-box gene in *Arabidopsis* based on analysis of co-expression networks and promoters. Int. J. Mol. Sci. 10(1): 116-132.

Wu, G., M. Y. Park, S. R. Conway, J. W. Wang, D. Weigel and R. S. Poethig. 2009. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. Cell 138(4): 750-759.

Wu, G. and R. S. Poethig. 2006. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by *miR156* and its target *SPL3*. Development. 133: 3539-3547.

Yamaguchi, A. and M. Abe. 2012. Regulation of reproductive development by non-coding RNA in Arabidopsis: to flower or not to flower. J. Plant Res. 125: 693–704.

Yan, L., M. Helguera, K. Kato, S. Fukuyama, J. Sherman and J. Dubcovsky. 2004. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat. Theor. Appl. Genet. 109: 1677-1686.

Yan, L., A. Loukoianov, G. Tranquilli, M. Helguera, T. Fahima and J. Dubcovsky. 2003. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 100: 6263-6268.

Zhang, X., Z. Zou, J. Zhang, Y. Zhang, Q. Han, T. Hu, X. Xu, H. Liu, H. Li and Z. Ye. 2011. Over-expression of sly-miR156a in tomato results in multiple vegetative and reproductive trait alterations and partial phenocopy of the sft mutant. FEBS Lett. 585(2): 435-439.

Evaluation of gene expression changes of *miR156* and *miR172* and their targeted genes (*AP2* & *SPL3*; vernalization factors) in two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars

Ashoori, N.[1], R. Fotovat[2], M. Mortezaefar[3] and N. Mehri[4]

ABSTRACT

Ashoori, N., R. Fotovat, M. Mortezaefar and N. Mehri. 2020. Evaluation of gene expression changes of *miR156* and *miR172* and their targeted genes (*AP2* & *SPL3*; vernalization factors) in two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars**. Iranian Journal of Crop Sciences. 21(4): 315-327. (In Persian).**

Floral transition through vernalization has a large influence on cold tolerance and agronomic traits in winter cereals. It is now apparent that in many plants small RNAs play critical roles in determination of the flowering time. There is evidence suggesting that the *miR156* and *miR172* families play a key role in the flowering transition of plants. In this study, the expression of two temporally regulated miRNA (*miR156* and *miR172*) and their targeted genes (*SPL3*, *AP2*) were investigated in the winter bread wheat cv. Norstar and the spring bread wheat cv. Baj in 2017-2018 cropping season. The vernalization was exposed to the cold treatments (4°C) for 2 and 14 days at seedling stage. Time to flowering was estimated using the final leaf number (FLN), which significantly decreased under vernalization treatments, only in winter cultivar 'Norstar'. Moreover, analysis of variance showed that vernalization treatments × cultivarsv interaction effect was significant on FLN. Comparison of gene expression using bootstrapping method showed that the expression of *miR172* was significantly down-regulated only in Norstar under vernalization treatments. Similarly, the expression of *miR156* was completely different under vernalization treatment in two cultivars. Increased expression of *miR156* in Baj cultivar was not significant, but vernalization treatment significantly decreased the expression of this gene in cv. Norstar. Although the induction of *AP2* expression during vernalization (14 days) was observed in both cultivars, but, the expression levels of *SPL3* were only significantly decreased in cv. Norstar, and this reduction was more in two-day vernalization. Unexpectedly, in this experiment, there was no relationship between up-regulation of both miRNA and down-regulation of their targeted genes in two bread wheat cultivars. These results demonstrated that molecular mechanism of flowering time in bread wheat is complex and still largely unknown.

Key words: Cold stress, Epigenetic, Flowering time, miRNA and Wheat.

Received: August, 2018 Accepted: January, 2020

1. Former MSc Student of University of Zanjan, Zanjan, Iran
2. Associate Prof., University of Zanjan, Zanjan, Iran (Corresponding author) (Email: r_fotovat@znu.ac.ir)
3. PhD Student, University of Zanjan, Zanjan, Iran
4. PhD Student, University of Zanjan, Zanjan, Iran